

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Identification par double-hybride de nouveaux partenaires potentiels du facteur d'élongation TFIIS de *Saccharomyces cerevisiae*

Van Driessche, Benoît

Award date:
2000

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Piera PORFIDO-BON
SECRETARIAT BIOLOGIE F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B-5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081/72 44 26 - Fax 081/72 44 20

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Identification par double-hybride de nouveaux partenaires potentiels
du facteur d'élongation TFIIS de *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Benoît Van Driessche

Juin 2000

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Identification par double-hybride de nouveaux partenaires potentiels du facteur d'élongation TFIIS de *Saccharomyces cerevisiae*

Van Driessche Benoît

Résumé

L'élongation de la polymérase II (POLII) constitue une étape de la transcription où s'exercent de multiples régulations encore mal comprises. Chez *S. cerevisiae*, le seul facteur spécifique de l'élongation connu à ce jour est TFIIS. Evolutivement conservée, la protéine intervient dans la reprise de l'élongation de la POLII après ses arrêts en « pausing ».

Afin de comprendre le mécanisme d'action de TFIIS, il est nécessaire d'identifier les partenaires avec lesquels cette protéine s'associe pour exercer son rôle au sein du complexe d'élongation de la POLII.

Dans ce but, nous avons procédé à un crible double-hybride avec la protéine TFIIS comme « appât » et une banque d'ADN génomique comme « proie ».

Ce crible nous a permis d'isoler 102 clones répondant positivement aux deux gènes rapporteurs utilisés. Le séquençage de ces clones est actuellement en cours. Deux clones identifiés, Spt8 et Srb9, revêtent un intérêt potentiel particulier qui est discuté.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

Promoteur: Professeur J. Vandenhaute

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Vandenhoute pour m'avoir permis de prendre goût à la génétique moléculaire et pour le dévouement extrême dont il a fait preuve durant ces six mois

Merci aux membres du jury, A. Tibor, J. Remacle, P. Mertens et P. Thuriaux pour avoir prêté un œil critique et attentif à ce manuscrit.

Un grand merci à Vincent et à Max pour le temps qu'ils m'ont accordé ainsi que pour leurs conseils, leur soutien et leur joie de vivre.

Je tiens également à remercier Sophie, Flore, Isa, Rose-Ma, Monique, Domi, David, Damien et Godefroid pour la bonne humeur qu'ils ont apportés à la vie dans le labo.

Merci à Lionel et à Philippe pour leurs conseils.

Je remercie finalement ma famille, mes amis ainsi qu'Annelise pour leur soutien moral et leurs encouragements.

Abréviations employées

3AT	3AminoTriazole
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APS	Persulfate d'Ammonium
ARN	Acide RiboNucléique
°C	Degré centigrade
dNTP	Désoxyribonucléique
ddNTP	Didésoxyribonucléique
DO	Densité Optique
EDTA	EthlèneDiamine-TétraAcétate
g	Gramme
kV	KiloVolt
l	Litre
LB	Milieu de Luria-Bertani
mA	Milliampère
μF	Microfaraday
mg	Milligramme
μg	Microgramme
min	Minute
ml	Millilitre
μl	Microlitre
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
nt	Nucléotide
O/N	Over Night
pb	Paire de Base
PCI	Phénol, Chloroforme, alcool Isoamylique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	PolyEthylène Glycol
rpm	Tour par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
sec	Seconde
SS-DNA	ADN de sperme de saumon
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TE	Tris-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tétra-Méthyl-Ethylène Diamine
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	Ultra-Violet
w/o	Without
YPD	Milieu Yeast Peptone Dextrose
Ω	Ohm

Plan du travail

Introduction

1. APERÇU GENERAL DE LA TRANSCRIPTION	1
1.1. <i>L'initiation</i>	1
1.1.1. Description d'un promoteur « type ».	2
1.1.2. Le recrutement du complexe transcriptionnel.	3
1.1.2.1. Etape préliminaire au recrutement de la polymérase.	3
1.1.2.2. Le recrutement de l'holoenzyme.	4
1.1.3. La libération du complexe transcriptionnel.	5
1.2. <i>L'élongation.</i>	5
1.2.1. Le « pausing ».	6
1.2.2. Le clivage.	6
2. LE CHOIX DE TFIIS COMME SUJET D'ETUDE.	7
2.1. <i>Description de TFIIS.</i>	7
2.2. <i>Approches expérimentales envisagées pour l'étude de TFIIS.</i>	8
2.3. <i>Le principe du crible double-hybride.</i>	9

But du travail

Résultats

1. Les outils disponibles au début du travail.	11
1.1. <i>Le plasmide « appât »</i>	11
1.1.1. Le pAS-TFIIS	11
1.1.2. Le pGBT9-TFIIS.	12
1.2. <i>Le plasmide « proie »</i>	12
2. Tests préliminaires au crible double-hybride	13
2.1. <i>Test de complémentation</i>	13
2.2. <i>Test de transactivation de la fusion Gal4 BD-TFIIS.</i>	14
2.3. <i>Conclusions des test préliminaires.</i>	15
3. Le crible double-hybride	16
3.1. <i>Explication de la méthode employée.</i>	16
3.2. <i>Mise en œuvre du crible.</i>	17

4. Analyse des résultats.	19
4.1. <i>Candidat Spt8.</i>	19
4.2. <i>Le candidat Srb9.</i>	20

Conclusions et Discussion

Perspectives

Matériel et méthodes

1. Matériel.	25
1.1. <i>Les tampons.</i>	25
1.2. <i>Les solutions</i>	27
2. Méthode.	30
2.1. <i>Souches et plasmide.</i>	30
2.1.1. souche de bactérie.	30
2.1.2. Souche de levures.	30
2.1.3. Les plasmides.	31
2.1.3.1. Le plasmide pGBT9.	31
2.1.3.2. Le plasmide pAS.	31
2.1.3.3. Le plasmide pACTII.	31
2.2. <i>Milieu de culture.</i>	32
2.2.1. Milieux de culture bactérien.	32
2.2.1.1. Milieu LB liquide.	32
2.2.1.2. Milieu LB solide.	32
2.2.2. Milieux de culture levurien.	32
2.2.2.1. Milieu YPD liquide.	32
2.2.2.2. Milieu YPD solide.	33
2.2.2.3. Milieu minimum.	33
2.2.2.4. Milieu synthétique.	33
2.2.2.5. Milieu synthétique + 3AT.	34
2.3. <i>Techniques relatives à l'utilisation de bactérie.</i>	35
2.4. <i>Techniques relatives à l'utilisation de levures.</i>	36
2.4.1. Transformation de levures.	36
2.4.1.1. Transformation par la technique au LiAc.	36
2.4.1.2. La méthode de transformation pour la banque double-hybride.	37
2.4.2. Coloration X-GAL.	38

2.5 <i>Techniques relatives à l'ADN.</i>	38
2.5.1. Préparation de la banque double hybride.	38
2.5.2. Extraction d'ADN de levure.	39
2.5.3. La Polymerase Chain Reaction (PCR).	39
2.5.3.1. Principe général.	39
2.5.3.2. Les paramètres et réactifs utilisés.	40
2.5.4. Le séquençage.	43
2.5.4.1. Le Séquençage manuel de produit PCR	43
2.5.4.2. Le Séquençage automatique.	46
2.5.5. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.	47

<h2 style="text-align: center;">Bibliographie</h2>
--

Introduction

1. Aperçu général de la transcription

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, comme chez tous les eucaryotes, il existe trois ARN polymérases nucléaires. Ces polymérases sont des complexes multiprotéiques jouant des rôles spécifiques : l'ARN polymérase I (POL I) est responsable de la synthèse du pré-ARNr 35S, précurseur des ARN ribosomiques 25S, 18S et 5.8S (Nogi *et al.*, 1991). L'ARN polymérase II (POL II) synthétise les ARN messagers ainsi que certains petits ARN (Small Nuclear RNA et Small Nucleolar RNA). L'ARN polymérase III (POL III), quant à elle, forme les ARN de transferts, l'ARN ribosomique 5S et les petits ARN non synthétisés par la POL II.

Dans la suite de ce chapitre, nous donnerons une description volontairement succincte et schématique du mécanisme de la transcription décrit chez un eucaryote simple. Le mécanisme de la transcription est communément divisé en trois étapes (pour une revue récente lire Hampsey, 1998) : l'initiation au cours de laquelle se réalisent le recrutement de la machinerie de transcription au niveau du promoteur et le démarrage de celle-ci ; l'élongation, étape durant laquelle l'ARN est synthétisé et, finalement, la terminaison assurant le « décrochage » de la polymérase et de l'ARN nouvellement formé.

1.1. L'initiation.

L'initiation est la première étape de la transcription. Elle consiste au recrutement par le promoteur de différents complexes multiprotéiques parmi lesquels on retrouve la « machinerie de transcription » définie ici comme étant l'ARN polymérase II et certains des facteurs généraux de transcription ou GTF (TFIIB, TFIIE, TFIIIF et TFIIH) (Hampsey et Reinberg, 1999).

1.1.1. Description d'un promoteur « type ».

Un promoteur « type » se compose de plusieurs boîtes (proximales, telle la boîte TATA, ou plus distales, telles les US). Chacune de celles-ci est formée de séquences nucléotidiques consensus (éléments CIS) servant au recrutement de protéines (facteurs TRANS). Ces facteurs TRANS sont répartis en deux groupes. Le premier comprend les facteurs généraux recrutés au niveau de tous les promoteurs et les complexes impliqués dans la modification de la structure chromatinienne. Le second groupe est celui des facteurs spécifiques de transcription (tel que Gal4).

La boîte que l'on peut rencontrer le plus directement en amont de l'ORF (Open ReadinG Frame) est la boîte TATA. Cette boîte, localisée à une distance de 40 à 120 paires de bases en amont de l'ATG chez *S. cerevisiae*, possède une séquence consensus TATA^A/_TA^A/_T. Signalons que, comme le montre l'existence de promoteurs dépourvus de cette boîte (promoteur TATA-less), cette séquence consensus n'est pas strictement requise pour le recrutement de la machinerie de transcription.

Plus en amont on retrouve diverses boîtes dont: les UAS (Upstream Activating Sequence) et les URS (Upstream Reressing Sequence). Ces dernières, ayant un rôle activateur ou répresseur respectivement, sont situées à des distances très variables de l'ATG et agissent indépendamment de la polarité. Elles sont reconnues par des facteurs TRANS spécifiques (les transactivateurs) lesquels entreront en contact avec la machinerie transcriptionnelle, soit de manière directe, soit indirectement via un complexe protéique appelé complexe médiateur/Srb.

L'accessibilité des boîtes composant le promoteur est influencée par la structure de la chromatine. En effet, on retrouve tout le long de l'ADN des complexes multiprotéiques, appelés nucléosomes (cfr. figure 1), qui structurent la chromatine (Varshavsky et Georgiev, 1975). Ces nucléosomes sont composés d'un noyau octamérique très basique, formé d'un couple de chacune des protéines histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel l'ADN est superenroulé. Lorsque cette structure se trouve sous sa forme condensée, le promoteur est dit « fermé » à la transcription. L'initiation de la transcription passera par la modification, ou « remodeling », de la chromatine entraînant l'« ouverture » du promoteur.

1.1.2. Le recrutement du complexe transcriptionnel.

Le recrutement du complexe transcriptionnel se fait au niveau des différentes boîtes du promoteur. Ce complexe comprend, entre autres, la machinerie de transcription et les protéines transactivatrices recrutées au niveau des UAS et URS. On y trouve également différents complexes tels que les complexes de « remodeling » chromatinien ou le complexe médiateur/Srb servant de lien physique entre les transactivateurs et la machinerie de transcription.

Deux modèles de recrutement très différents de ces complexes sont communément admis :

- le premier (Buratowski *et al.*, 1989) postule un recrutement séquentiel du complexe transcriptionnel. Les différents facteurs de transcription s'associent les uns à la suite des autres dans un ordre précis pour former un complexe de pré-initiation (PIC). Ce complexe recrute ensuite la polymérase au niveau du promoteur.
- Le second modèle (Thompson *et al.*, 1993) propose, sur base de données de purification biochimique, un recrutement d'un énorme complexe préexistant appelé holoenzyme. Cet holoenzyme comprend le complexe médiateur/Srb ainsi que la machinerie de transcription.

Dans la suite de cet exposé, seul le modèle de recrutement d'un complexe holoenzymatique sera décrit. Notons cependant que sur base de données biochimiques, la composition de l'holoenzyme est fortement dépendante du mode de purification. On ne peut donc exclure la possibilité que, dans une cellule, différents holoenzymes coexistent, ni même que les deux modèles de recrutement puissent être vérifiés.

1.1.2.1. Etape préliminaire au recrutement de la polymérase.

L'initiation semble commencer par l'arrivée de trois groupes de protéines (figure 1A) qui serviront ensuite au recrutement de l'holoenzyme.

Le premier groupe de protéines comprend les transactivateurs spécifiques (activateurs ou répresseurs) recrutés au niveau des UAS ou des URS. Ces protéines interagissent, de manière directe ou via le complexe médiateur/Srb, avec la polymérase afin de réguler le taux de transcription au niveau de l'initiation.

Le deuxième complexe, appelé facteur de transcription TFIID, (Dymlach *et al.*, 1991), est recruté au niveau de la boîte TATA via la TBP (TATA Binding Protein) présente dans ce complexe. Celui-ci, permettant le recrutement de la polymérase, comprend également différents TAF (TBP Associated Factor) jouant des rôles variés. Citons par exemple Taf145 permettant la modification de la structure de la chromatine grâce à son activité acétyltransférase sur les protéines histones H3 et H4. Cette acétylation entraîne l'apparition de charges négatives réduisant la force du lien entre l'ADN et l'histone ce qui entraîne un « relâchement » des nucléosomes. Taf61, Taf60 et Taf17, quant à eux, sont structurellement semblables aux histones H2B, H4 et H3 respectivement (Burley et Roeder, 1996), et pourraient permettre un déplacement des nucléosomes par « remplacement » des sous-unités de ceux-ci et ainsi faciliter l'arrivée de TFIID au niveau de la boîte TATA.

Le dernier groupe comprend les complexes SAGA et SWI/SNF intervenant dans le « remodeling » de la chromatine. Le complexe SAGA, responsable de l'acétylation des histones (Roberts et Wilson, 1997), contient une acétyltransférase produit du gène *GCN5* ainsi que les protéines Ada2 et 3 (coactivateurs de Gcn5) et Spt (faisant le lien entre le complexe SAGA et la TBP). Au sein de ce complexe, Gcn5 est responsable du transfert d'un groupement acétyl (Brownell *et al.*, 1996) sur l'extrémité N-terminale des histones H3 et H2B induisant un « relâchement » des nucléosomes.

Le complexe SWI/SNF, quant à lui, cause le « remodeling » de la chromatine suite au transfert d'un groupement phosphates sur les histones H2A et H2B au niveau de leur extrémité N-terminale (Kingston *et al.*, 1996). Cette phosphorylation est réalisée par une kinase ADN dépendante (Swi2 ou Snf2) présente dans ce complexe. L'effet global est ce que l'on appelle « ouverture » du promoteur.

1.1.2.2. Le recrutement de l'holoenzyme.

Une fois le promoteur « ouvert », l'holoenzyme est recruté au niveau de celui-ci par l'intermédiaire de la TBP et de facteurs de transactivation spécifiques comme repris dans la figure 1B.

Le facteur général de transcription TFIID fait le lien entre la boîte TATA et la polymérase. Ce lien est indirect et passe par l'intermédiaire des autres facteurs généraux de la transcription (Pan *et al.*, 1997). Il est à noter que la présence, de ces

facteurs généraux de transcription ainsi que de la polymérase est nécessaire et suffisante pour permettre le début de la transcription.

La jonction entre les transactivateurs spécifiques, présents au niveau des UAS et des URS, et la machinerie transcriptionnelle est réalisée grâce au complexe médiateur/Srb (Kim *et al.*, 1994). Ce complexe contient les protéines Srb 2, 4, 5, 6 et 7 identifiées comme activateurs de la transcription, Med 1, 2, 4, 6, 7 et 8 faisant le lien entre ce complexe et les activateurs spécifiques ainsi que d'autres protéines (Gal1, Sin4, Rgr1, Rox5 et Pgd1). Ces dernières protéines ont des rôles d'activation ou de répression. Ce complexe peut donc jouer un rôle d'activateur de la transcription mais également rôle de répresseur. Le complexe médiateur permet ainsi une régulation fine du taux de transcription.

1.1.3. La libération du complexe transcriptionnel.

Cette phase charnière entre l'initiation et l'élongation correspond à la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de la plus grande sous-unité de la polymérase (Bartolomei *et al.*, 1988). Cette phosphorylation du CTD, heptapeptide (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) répété 26 ou 27 fois chez *S. cerevisiae*, cause l'apparition de charges négatives sur celui-ci.

La phosphorylation du CTD, notamment au niveau des Ser 2 et 5, est due à une protéine kinase (Kin28) (Feaver *et al.*, 1994). Cette kinase ADN dépendante, ainsi que la cycline qui lui est associée, appartenant au facteur général de transcription TFIIF, est activée par l'intermédiaire du complexe médiateur/Srb.

1.2. L'élongation.

L'élongation semble nécessiter la présence de nombreux facteurs, certains étant spécifiques de l'élongation tel que TFIIS chez *S. cerevisiae* et d'autres impliqués également dans l'initiation (le complexe médiateur et les complexes intervenant dans la phosphorylation du CTD en sont des exemples).

La synthèse d'ARN, finement régulée, est une étape dynamique dont le rythme peut varier considérablement pouvant passer d'une vingtaine de nucléotides par seconde à l'arrêt complet de la polymérase.

1.2.1. Le « pausing ».

Les changements de rythme observés en cours d'élongation peuvent être liés à des problèmes de différentes natures (Kassavetis et Chamberlin, 1981). La progression de la polymérase peut en effet être freinée par toute une série de contraintes situées en aval de la région transcrite. Citons à titre d'exemple la présence de nucléosomes ou encore les modifications topologiques (superenroulement) de l'ADN. Cette synthèse peut également être arrêtée par des mécanismes touchant de façon plus « globale » la transcription, tel que la diminution du « pool » de ribonucléotides présent dans la cellule.

Ces problèmes peuvent non seulement faire diminuer le rythme de la polymérase, mais aussi conduire, comme l'illustre la figure 2B, à un arrêt momentané de la machinerie de transcription. La polymérase, toujours catalytiquement active, peut après un temps de pause redémarrer. Cette reprise de la transcription exige le recule de la polymérase et le clivage de l'extrémité de l'ARN synthétisé.

1.2.2. Le clivage.

Le clivage de l'ARN naissant (figure 2D), nécessaire à la reprise de la synthèse par la machinerie de transcription, est causé par une activité endonucléasique présente dans la polymérase elle-même (Wang et Hawley, 1993). Cependant, le taux avec lequel la polymérase clive l'ARN est très faible lorsque celle-ci l'effectue seule. Pour augmenter l'activité endonucléasique de la polymérase, le recrutement d'un facteur de transcription (TFIIS) est nécessaire (Johnson et Chamberlin, 1994).

2. Le choix de TFIIS comme sujet d'étude.

2.1. Description de TFIIS.

TFIIS, facteur spécifique de la polymérase II, est une protéine de 309 acides aminés encodée par le gène *PPR2* (Sawadogo *et al.*, 1980) (la séquence protéique de TFIIS est reprise dans l'annexe 1). Ce facteur d'élongation est divisé en trois domaines contenant entre autres des domaines potentiels d'interactions protéines-protéines tel un doigt de zinc dans sa partie C-terminale (Olmsted *et al.*, 1998). Le clivage induit par TFIIS entraîne la libération de petits fragments d'ARN (le premier, C1, a une taille de 12 nt et les suivants, une taille de 2 nt) (Awrey *et al.*, 1997). Ce clivage de l'extrémité 3' de l'ARN néoformé pourrait permettre à celui-ci de se repositionner au niveau du site catalytique de la polymérase et ainsi permettre une reprise de l'élongation (Johnson et Chamberlin, 1994). Comme le suggère sa conservation évolutive des archaebactéries à l'homme (Tableau 1), cette protéine pourrait jouer un rôle crucial dans l'élongation.

Espèce	Identité avec <i>S. cerevisiae</i> (en %)
<i>Thermococcus celer</i>	26 (a)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	35
<i>Caenorhabditis elegans</i>	29
<i>Drosophila melanogaster</i>	29
<i>Xenopus laevis</i>	32
<i>Mus musculus</i>	32
<i>Rattus norvegicus</i>	30
<i>Homo sapiens</i>	30

Tableau 1 : Conservation de TFIIS dans différents organismes.

(a) L'identité ne couvre dans ce cas-ci que la partie C-terminale de la protéine levurienne.

Sur base de données biochimiques (Tan *et al.*, 1995), il semble que l'étape d'élongation nécessite aussi l'intervention de nombreux autres partenaires. En effet, la purification de la machinerie de transcription au moyen de ce facteur TFIIS a également permis d'isoler des protéines impliquées dans la phosphorylation du CTD

ou encore certains facteurs généraux de transcription (Greenblatt, 1997). Ceci laisse dès lors supposer l'intervention d'une machinerie complexe lors de l'élongation. Mentionnons que d'autres complexes pourraient être également recrutés en cours d'élongation, notamment des protéines de modification de topologie de l'ADN (hélicases ou topoisomérases).

2.2. Approches expérimentales envisagées pour l'étude de TFIIS.

Compte tenu du rôle central proposé pour le facteur d'élongation TFIIS et de l'intervention probable de nombreux autres partenaires, nous nous sommes intéressé à la mise en évidence *in vivo* des interactions pouvant exister au sein d'un complexe faisant intervenir TFIIS.

L'étude des partenaires de TFIIS semble en effet être un moyen pour mieux comprendre les régulations présentes au niveau de l'élongation. Différentes approches sont envisageables :

- Recherche des protéines ayant un lien génétique avec TFIIS au moyen d'un crible de suppression multicopie.

La suppression multicopie (ou par dosage génique) implique qu'un phénotype lié à la mutation d'une protéine puisse être « compensé » par la surexpression d'une autre protéine. Cette approche aura donc pour but d'identifier les partenaires « fonctionnels » de notre protéine d'intérêt.

Dans ce cas précis, la délétion du gène *PPR2* codant pour TFIIS entraîne une sensibilité au 6-azauracil (6AU) (Hubert *et al.*, 1983). Le crible consisterait donc en une identification des protéines dont la surexpression permettrait une restauration de la croissance de souche $\Delta ppr2$ sur un milieu contenant du 6AU.

- Recherche des protéines ayant un lien physique avec TFIIS au moyen d'un crible double-hybride ou par des approches biochimiques telles que la co-immunoprécipitation.

Parmi ces différentes approches, nous avons privilégié la recherche des protéines interagissant physiquement avec TFIIS au moyen d'un crible double-hybride.

2.3. Le principe du crible double-hybride.

Le double-hybride est une approche moléculaire, mise au point par Fields et Song en 1989, permettant la mise en évidence d'interactions *in vivo* entre deux protéines.

Ce système se base sur la division des transactivateurs en deux domaines fonctionnels distincts : le domaine de liaison à l'ADN ou BD et le domaine de transactivation ou AD. Le domaine de transactivation n'étant pas capable de se fixer à l'ADN et le domaine de liaison à l'ADN ne pouvant à lui seul activer la transcription, la séparation physique de ces deux domaines entraîne une perte de fonction du transactivateur.

Dans le système du double-hybride, repris dans la figure 3 le domaine BD de liaison à l'ADN est fusionné à la protéine d'intérêt X tandis que le domaine d'activation AD est fusionné à une protéine Y. Dans ce cas, un complexe activateur pourra être reconstitué si, et seulement si, X interagit physiquement avec Y. La capacité de transactivation du facteur sera mise en évidence par la transcription de gènes rapporteurs.

Ce système double-hybride permet donc de tester aisément des interactions supposées, et ce, *in vivo*. La puissance de ce système est cependant d'offrir la possibilité de tester toutes les interactions potentielles d'une protéine d'intérêt avec l'ensemble d'un protéome. Dans ce cas précis, des fragments d'une banque génomique seront fusionnés au domaine d'activation de Gal4 et testés lors d'un crible.

But du travail

But du travail

Historiquement, l'élongation a été considérée comme une simple étape de transition, entre l'initiation et la terminaison. Depuis une dizaine d'années cependant, on sait que l'élongation est une étape soumise à de nombreuses régulations (pour une revue lire Uptain *et al.*, 1997). Ainsi, certains gènes sont majoritairement régulés au niveau de cette étape ; citons à titre d'exemple le gène codant pour la protéine HSP70 chez la drosophile (Rougvie et Lis, 1990).

La purification biochimique d'un complexe de transcription au moyen de TFIIS a permis d'isoler de nombreuses protéines susceptibles d'être impliquées dans l'élongation (Greenblatt, 1997). Ainsi, certains facteurs généraux de transcription ou encore des protéines impliquées dans la phosphorylation du CTD ont été isolés dans ce complexe.

Actuellement, TFIIS est la seule protéine spécifique de l'élongation identifiée chez *S. cerevisiae*. Cette protéine évolutivement conservée est impliquée dans le « pausing » survenant en cours de transcription.

Le facteur TFIIS, semblant jouer un rôle crucial dans l'élongation, pourrait occuper une position centrale dans le complexe transcriptionnel. Ceci, nous a incité à rechercher les protéines interagissant physiquement avec TFIIS par une approche moléculaire. Dans ce but, un crible double-hybride a été réalisé en utilisant TFIIS comme « appât ».

Résultats

1. Les outils disponibles au début du travail.

Pour rappel, la réalisation d'un crible double-hybride nécessite la construction d'un plasmide « appât » (figure 4A) encodant, dans notre cas, la fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de *Gal4* et TFIIS (BD-TFIIS). Les partenaires de TFIIS seront isolés par le crible d'une banque de fusion entre le domaine d'activation de *Gal4* (AD) et des fragments d'ADN génomique. Ces plasmides seront appelés plasmide « proie ».

Les plasmides « appât » et « proie » sont cotransformés dans une souche test (Y190). Comme décrit au point 2.3. de l'introduction, l'interaction entre la fusion BD-TFIIS et un partenaire potentiel (AD-X) sera mise en évidence par l'expression des gènes rapporteurs *HIS3* et *LacZ* (figure 4B) présents dans la souche Y190. Ces interactions seront donc visualisées par la capacité de la souche test à pousser sur un milieu sans histidine et par un test de coloration β -Gal.

1.1. Le plasmide « appât »

Au début de ce travail deux plasmides codant pour la fusion BD-TFIIS étaient à notre disposition.

1.1.1 Le pAS-TFIIS

Ce plasmide « High copy » encode la fusion TFIIS-domaine de liaison à l'ADN du transactivateur *Gal4* ainsi qu'un marqueur d'auxotrophie *TRP1*. Les souches Y190 transformées par ce plasmide seront donc sélectionnées sur un milieu ne contenant pas de tryptophane.

Cette fusion a été réalisée par clonage du gène *PPR2* (encodant TFIIS) en aval du domaine de liaison à l'ADN de *Gal4* et ce au niveau du site multiple de clonage restreint en *Bam*HI et *Sma*I. Cette construction a ensuite été séquencée au niveau de la fusion afin de vérifier que les protéines soient bien en phase.

1.1.2. Le pGBT9-TFIIS.

Tout comme le pAS-TFIIS, ce vecteur « High copy » encode une fusion BD-TFIIS (cloné en *Bam*HI et *Sma*I) et possède un marqueur d'auxotrophie *TRP1*.

Le taux d'expression du pAS est cependant nettement plus élevé que celui du pGBT9. Notons à ce propos que cette « surexpression » de la protéine de fusion encodée par le pAS est parfois à l'origine de la sélection d'interactions double-hybride non spécifiques les quelles sont à considérer comme des faux-positifs.

Il est également à noter que ces deux plasmides possèdent en aval du domaine de liaison à l'ADN des sites multiples de clonage différents. Les protéines de fusion encodées par ces plasmides se différencient dès lors par 9 acides aminés.

1.2. Le plasmide « proie »

Le plasmide « proie » utilisé lors de ce crible est le pACTII. Ce vecteur « High copy » possédant le marqueur de sélection *LEU2*, encode la fusion entre le domaine d'activation de Gal4 et des fragments d'ADN génomiques de *S. cerevisiae* d'une taille moyenne de 700 paires de bases. Ces fragments ont été obtenus par sonication d'ADN génomique de *S. cerevisiae* et clonage dans le vecteur pACTII par l'ajout d'un « polylinker ».

Lors de ce crible, la sélection de la souche test transformée par les plasmides « appât » et « proie » se fera sur un milieu ne contenant ni tryptophane ni leucine.

2. Tests préliminaires au crible double-hybride

En préliminaire du crible proprement dit, un test de complémentation et un test de transactivation ont été réalisés afin de vérifier la faisabilité de ce crible.

2.1. Test de complémentation

La complémentation est une approche génétique qui consiste en la restauration d'un phénotype dans une souche mutée pour le gène X par l'apport d'une ou plusieurs copies sauvages de ce gène. Cette copie peut avoir pour origine le même organisme (complémentation homologue) ou un organisme différent (complémentation hétérologue).

La délétion du gène *PPR2* encodant TFIIS est responsable d'une sensibilité au 6-Azauracil (6AU). La complémentation d'une souche $\Delta ppr2$ sera dès lors mise en évidence par la restauration de la résistance au 6AU. Le test de complémentation aura pour but d'éprouver la fonctionnalité de la protéine de fusion Gal4 BD-TFIIS

En pratique, les deux plasmides (pAS et pGBT9) encodant la fusion Gal4 BD-TFIIS ont été transformés séparément dans une souche $\Delta ppr2$. Les transformants ont ensuite été striés sur un milieu sans tryptophane, (sélection des plasmides pAS et pGBT9), contenant différentes concentrations en 6AU (0, 50 et 100 μg par ml de milieu) (Figure 3).

Par ailleurs une souche sauvage (YPH500) et la souche $\Delta ppr2$, utilisées comme contrôle positif et négatif respectivement, ont été striées sur un milieu synthétique complet, contenant les mêmes concentrations en 6AU (Figure 3).

Comme le montre la figure 5, la souche $\Delta ppr2$ présente une sensibilité au 6AU à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La souche sauvage par contre ne montre aucun retard de croissance aux différentes concentrations testées. Par ailleurs, la souche $\Delta ppr2$ transformée par le pAS-TFIIS présente une croissance comparable à la souche sauvage, tandis que la souche transformée par le pGBT9-TFIIS montre une nette sensibilité au 6AU à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Il semble sur base de cette donnée de complémentation par le pAS-TFIIS que la protéine de fusion Gal4 BD-TFIIS est capable de remplacer fonctionnellement la protéine TFIIS sauvage. L'absence de complémentation par le pGBT9-TFIIS montre cependant qu'un taux d'expression élevé de cette fusion soit nécessaire à cette complémentation.

2.2. Test de transactivation de la fusion Gal4 BD-TFIIS.

Lors de notre crible, nous avons employé, comme indiqué dans la figure 3, le gène *HIS3* en tant que gène rapporteur. La plupart des protéines de fusion (Gal4 BD-Y) étant capables d'activer par elle-même la transactivation de ce gène rapporteur, du 3AT (Triaminotriazole) est ajouté au milieu de culture afin de réduire cette transactivation basale. Ce 3AT, inhibiteur compétitif de la protéine encodée par le gène *HIS3*, permet de réduire cette transactivation basale (figure 6)

Il est donc nécessaire, préalablement au crible, de déterminer la concentration en 3AT à ajouter au milieu pour minimiser le bruit de fond dû à Gal4 BD-TFIIS. Dès lors seuls les clones montrant une transactivation plus forte que la transactivation basale causée par la protéine Gal4 BD-TFIIS, seront capables de croître sur ce milieu.

En pratique, la souche test servant à la réalisation du crible a été transformée par les vecteurs pAS-TFIIS et pGBT9-TFIIS. Ces souches ont ensuite été striées sur un milieu sans tryptophane (afin d'assurer une pression de sélection sur les plasmides) ni histidine et contenant différentes concentrations en 3AT (Figure 7).

Sur le même milieu, la souche Y190 transformée par un plasmide encodant la protéine de fusion BD-A12.2 (une sous-unité de la POLI) a également été striée. Cette souche présentant une sensibilité au 3AT à une concentration de 25 mM sera utilisée comme contrôle interne de croissance.

Comme nous le montre la figure 7, les souches transformées par le plasmide pAS-TFIIS et pGBT9-TFIIS montrent une sensibilité au 3AT à une concentration de 50 mM. La croissance résiduelle observée à cette concentration nous contraint cependant à utiliser une concentration supérieure (100 mM) pour la réalisation du crible.

Afin de faire un choix définitif quant au plasmide « appât » à employer lors du crible, une transformation de la banque a été réalisée à petite échelle. En pratique, les souches contenant le pAS-TFIIS et pGBT9-TFIIS ont été transformées avec la banque double-hybride. Les transformants obtenus ont été étalés sur un milieu sans tryptophane ni leucine (pression de sélection sur les plasmides) et sans histidine mais contenant 100 mM de 3AT.

Lors de cette transformation (données non montrées) la souche contenant la protéine de fusion BD-TFIIS encodée par le pAS a engendré un bruit de fond tel qu'il ne permettait pas d'isoler des colonies positive pour l'interaction recherchée. Ce bruit de fond étant nettement moins marqué avec le pGBT9-TFIIS notre choix s'est porté sur ce dernier plasmide.

2.3. Conclusions des test préliminaires.

Au terme de ces tests, nous avons décidé de réaliser le crible avec la souche contenant la protéine de fusion BD-TFIIS encodée par le pGBT9 et ce sur une

concentration de 100 et 200 mM de 3AT. Le choix de ces deux concentrations se base d'une part sur le test préliminaire montrant une croissance résiduelle de cette souche jusqu'à une concentration en 3AT de 50 mM et d'autre part sur le désir d'isoler des interactions fortes ainsi que des interactions plus faibles (seulement détectable sur un milieu ne contenant que 100 mM de 3AT).

3. Le crible double-hybride

3.1. Explication de la méthode employée.

En pratique, pour la réalisation de ce crible la souche test Y190 contenant le plasmide pGBT9-TFIIS a été transformée par la banque de fusion double-hybride et mise à incuber une semaine à 30°C sur un milieu sans tryptophane, sans leucine et sans et histidine mais contenant 100 ou 200 mM de 3AT. Les transformants ont ensuite été pointés quotidiennement et striés sur un milieu identique.

Les transformants striés ont ensuite été répliqués au moyen d'un velours sur des boîtes sans tryptophane et sans leucine avec du X-Gal en surcouche, comme présenté au point 2.4.2. du matériel et méthode, afin de réaliser un test β -gal. Une souche exprimant le gène *LacZ* deviendra bleue après la coloration.

Cette première coloration sert donc de test pour le gène rapporteur *LacZ* et permet une la classification arbitraire des clones établie sur base de l'intensité de la coloration (+, ++ et +++). On constate à la figure 8 que toutes les colonies ayant répondu positivement au premier gène rapporteur (*HIS3*) ne colorent pas. On observe également sur cette figure plusieurs niveau de coloration correspondant aux trois catégories définies.

Les clones ayant montrés une coloration sont ensuite restriés sur un milieu sans tryptophane et sans leucine. Ces stries ont été de nouveau répliquées et recolorées. Les colonies ne présentant pas une coloration homogène ont été éliminées (un exemple de colonie présentant une coloration hétérogène est repris dans la figure 9).

Les plasmides des souches ayant répondu positivement aux deux gènes rapporteurs (*HIS3* et *LacZ*) ont ensuite été extraits.

Les plasmides « appât » et « proie » étant extraits en même temps de la levure, une étape d'amplification spécifique du pACTII par PCR en utilisant des primers appropriés est nécessaire avant le séquençage de l'insert de la banque.

Les primers employés pour réaliser cette PCR, sont les primers 242 et 243 spécifiques du pACTII. Le primer 242 s'hybride en amont du polylinker réalisant la jonction entre le domaine d'activation et les fragments de la banque, le primer 243 quant à lui reconnaît la séquence du terminateur présent en aval du site multiple de clonage du pACTII (une représentation de ce plasmide est présentées dans le point 2.1.3.3. du matériel et méthode). Cette PCR permet donc non seulement d'amplifier spécifiquement la séquence encodant la fusion AD-banque mais aussi d'estimer la taille de fragment cloné dans ce vecteur.

Les produits PCR ont ensuite été purifiés et séquencés. Nous avons employé le primer 242 comme amorce pour ce séquençage. L'emploi de ce primer nous a donc permis de déterminer la séquence nucléotidique au niveau de la fusion entre le domaine d'activation et la « proie ». Grâce à ceci, nous avons pu vérifier que cette ORF était bien en phase avec le gène codant le domaine de liaison de *Gal4* et identifier le fragment d'ORF présent sur le pACTII par recours au génome de *S. cerevisiae*.

3.2. Mise en œuvre du crible.

Six transformations de la banque ont été réalisées lors de ce crible pour un total de 12 350 000 transformants répartis sur deux concentrations en 3AT soit 9 850 000 sur 200 mM et 2 500 000 sur 100 mM. Un tableau reprenant les résultats complets de ces transformation est repris au tableau 2.

Sur ces 12 350 000 transformants « screenés », 286 clones ont été isolés comme répondant au premier gène rapporteur. Comme indiqué dans le tableau 3, ces 286 clones sont répartis sur les deux concentrations testées à raison de 78 et 208 sur, respectivement, 100 et 200 mM de 3AT. Ce tableau reprend également la répartition de ces clones en fonction de la durée de l'incubation ayant servi à leur isolement.

Sur les 286 stries réalisées, 42 clones n'ont pas repousser. Les autres clones ont ensuite été colorés une première fois. Le résultat de cette coloration, négatifs pour 130 clones nous a conduit à éliminer ceux-ci (tableau 4A). La répartition en fonction de l'intensité de la coloration des clones est également reprise dans ce tableau.

Les clones restants ont été restriés puis colorés une seconde fois. Au terme de ces étapes, seuls 102 (20 sur 100 mM de 3AT et 82 sur 200 mM) clones répondant positivement aux deux gènes rapporteurs ont été sélectionnés (tableau 4B).

A ce jour, 52 extractions plasmidiques sur les 102 clones positifs ont été réalisées. La PCR a permis d'amplifier 30 inserts à partir de ces plasmides.

4. Analyse des résultats.

Actuellement 13 clones ont été séquencés, nous permettant d'isoler deux fragments des ORF encodant pour les protéines Spt8 et Srb9. Ces fragments ont été « repêchés » plusieurs fois (9 fois dans le cas de *SPT8* et 4 fois pour *SRB9*) dans des clones indépendants.

4.1. Candidat Spt8.

Des fragments de cette ORF de 602 acides aminés ont été identifiés dans 5 clones indépendants. La figure 10A représente cet ORF ainsi que le positionnement de ces 5 fragments. Sur cette figure, nous pouvons remarquer que le début de ces fragments se situe entre les résidus 235 et 347. Au moyen des PCR réalisées avant le séquençage nous pouvons estimer que ces fragments s'arrêtent entre le résidu 457 et la fin de l'ORF. On remarque également sur cette figure que le recouvrement de ces fragments est d'environ 130 acides aminés.

Remarquons que l'un de ces fragments a été isolés à deux reprises, nous permettant d'accorder plus de confiance en celui-ci.

Sur base des colorations β -Gal, ces clones peuvent être répartis en deux groupes : le premier, regroupant 2 clones, correspond à une coloration forte (+++) et le second, contenant 3 clones, montre une coloration faible (+) (la coloration des clones est également reprise dans la figure 10A). On remarque que l'intensité de la coloration augmente pour les clones contenant la partie C-terminale de la protéine. Ceci suggère que cette région serait en cause dans la force de l'interaction.

Sur base de la séquence protéique de Spt8 (reprise en annexe B), on remarque la présence d'un domaine WD40, domaine connu comme étant un domaine d'interaction protéique. Ce domaine, composé de 44 à 60 résidus, contient, comme son nom l'indique, un dimère tryptophane-aspartate répété deux fois.

4.2. Le candidat Srb9.

Cette ORF de 1420 acides aminés, identifiée grâce à 3 clones indépendants est reprise dans la figure 10B. Sur cette figure, nous pouvons remarquer que le début des fragments isolés se situe entre les résidus 235 et 417. La fin de ces fragments, quant à elle, se situe dans une région allant acides aminés 600 à 900. Comme montré sur cette figure, le recouvrement de ces fragments est d'environ 170 résidus.

Dans ce cas-ci, chaque clone présente une coloration différente. Il semble quand même se dégager une corrélation entre la position du fragment identifié et l'intensité de la coloration. En effet, comme indiqué à la figure 10B, le fragment contenant les résidus les plus en aval de l'extrémité C-terminale montre une coloration plus importante que les autres fragments. Ceci nous suggère dès lors que cette partie de la protéine est importante pour l'interaction entre Srb9 et TFIIS.

4.2. Le candidat Srb9.

Cette ORF de 1420 acides aminés, identifiée grâce à 3 clones indépendants est reprise dans la figure 10B. Sur cette figure, nous pouvons remarquer que le début des fragments isolés se situe entre les résidus 235 et 417. La fin de ces fragments, quant à elle, se situe dans une région allant acides aminés 600 à 900. Comme montré sur cette figure, le recouvrement de ces fragments est d'environ 170 résidus.

Dans ce cas-ci, chaque clone présente une coloration différente. Il semble quand même se dégager une corrélation entre la position du fragment identifié et l'intensité de la coloration. En effet, comme indiqué à la figure 10B, le fragment contenant les résidus les plus en aval de l'extrémité C-terminale montre une coloration plus importante que les autres fragments. Ceci nous suggère dès lors que cette partie de la protéine est importante pour l'interaction entre Srb9 et TFIIS.

Conclusions,
Discussion
et
Perspectives

Conclusions et discussion

Chez *S. cerevisiae*, seul le facteur de transcription TFIIS est spécifique de l'élongation. Cette protéine, requise pour le clivage de l'ARN lorsque la polymérase est bloquée à un site de pause, permet la reprise de la transcription. Ce facteur d'élongation évolutivement conservé semble dès lors jouer un rôle central lors de cette étape.

Par ailleurs, l'élongation semble nécessiter l'intervention de nombreux complexes pour son fonctionnement. La présence de TFIIS au sein de ce complexe ainsi que le rôle joué par ce facteur nous ont incité à rechercher les partenaires physiques de TFIIS par un crible double-hybride.

Ce crible a permis la mise en évidence de deux partenaires potentiels de TFIIS : Srb9 et Spt8.

Le candidat Srb9

Cette protéine de 1420 acides aminés semble jouer un rôle de stabilisation du complexe comprenant les protéines Srb10 et 11 (respectivement une kinase de type CDK et sa cycline). Le complexe formé par ces trois protéines est responsable d'une régulation inhibitrice de l'initiation de la transcription via la phosphorylation du CTD. En effet, la protéine kinase Srb10 semble empêcher le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau du complexe de préinitiation par phosphorylation de ce CTD.

Cependant, outre ce rôle de régulation lors de l'initiation, ce complexe pourrait également jouer un rôle dans l'élongation. En effet, la purification d'un complexe transcriptionnel au moyen de TFIIS a permis, chez l'homme, d'isoler la protéine CDK8 (homologue humain de Srb10). Le rôle supposé de ce complexe dans la régulation de l'élongation n'est cependant pas défini.

Lors du crible double-hybride que nous avons réalisé, 3 fragments indépendants de la protéine Srb9 ont été isolés. Ces fragments, couvrant une zone comprise entre les acides aminés 233 et 900 de cette protéine, présente une région de recouvrement allant des résidus 427 à 600.

Les tests de coloration β -Gal réalisés sur ces clones ont permis de les classer en trois catégories (colorations +, ++ et +++) comme décrit dans la figure 8B. Sur base du séquençage du clone montrant la coloration la plus intense, il semble que la région comprises entre les acides aminés 427 et 900 joue un rôle important dans l'interaction entre Srb9- et TFIIS.

Les tests de coloration β -Gal réalisés sur ces clones ont permis de les classer en trois catégories (colorations +, ++ et +++) comme décrit dans la figure 8B. Sur base du séquençage du clone montrant la coloration la plus intense, il semble que la région comprises entre les acides aminés 427 et 900 joue un rôle important dans l'interaction entre Srb9- et TFIIS.

L'appartenance de Srb9 au complexe de transcription impliquant la polymérase II et la co-purification, chez l'homme, de l'homologue de Srb10 et de TFIIS, nous permettent d'avoir une relative confiance dans l'interaction mise en évidence lors de ce crible.

Le candidat Spt8.

Cinq fragments indépendants de cette protéine de 602 acides aminés ont été isolés lors de ce travail. Ces fragments, possédant une région commune de 133 acides aminés, couvrent la partie carboxy-terminale de la protéine à partir du résidu 235.

Les résultats de la coloration β -gal de ces clones permet de séparer ceux-ci en deux groupes. Le premier comprend trois clones indépendants se colorant faiblement (coloration +) tandis que le second, regroupe deux clones indépendants montrant une coloration intense (coloration +++) lors de ce test.

Ces deux derniers clones se différenciant du premier groupe par la présence d'une extrémité carboxyterminale plus longue, il semble que cette région joue un rôle important dans l'interaction avec TFIIS. Par ailleurs, la recherche de motifs protéiques dans ces clones nous a permis de mettre en évidence la présence d'un domaine d'interaction protéine-protéine de type WD40. Ce motif caractérisé par la présence d'une répétition des résidus tryptophane et aspartate pourrait dès lors être impliqué dans l'interaction avec le facteur d'élongation TFIIS. De plus, si on compare la séquence de *Sc. Spt8* et celle d'un homologue supposé chez *S. pombe* (figure) on observe une conservation de la région C-terminale. Ceci suggère un rôle potentiel pour ces régions dans la protéine.

Tout comme Srb9, Spt8 est une protéine spécifique du système de transcription par l'ARN polymérase II. Cette protéine impliquée dans l'initiation de la transcription fait le lien entre la TBP (TATA Binding Protein) et le complexe SAGA responsable de

l'acétylation des histones. Actuellement, aucune donnée ne semble montrer un rôle potentiel de cette protéine durant l'élongation. Cependant, la présence de protéines impliquées dans l'acétylation des histones en cours d'élongation étant clairement montrée chez les eucaryotes supérieurs (Wittschieben *et al.*, 1999.), la participation de tels complexes incluant Spt8 pourrait également être requise chez les eucaryotes unicellulaires tels que *S. cerevisiae*.

L'identification de seulement deux partenaires potentiels de TFIIIS à partir de 13 clones séquencés et ce, sur base d'un certain nombre de clones indépendants, semble montrer une véritable spécificité quant aux partenaires recrutés par ce facteur d'élongation. De plus, la réalisation de nombreux cribles double-hybride dans le cadre du projet européen « TAPIR » a permis de déterminer un certain nombre d'interactants « faux positif ». Ces protéines interagissant vraisemblablement avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ne sont donc pas considérés comme de véritables partenaires double-hybride. Le fait que nos deux partenaires potentiels Spt8 et Srb9 ne soient pas repris comme faisant partie de ces faux-positif renforce dès lors la confiance que l'on peut attribuer à ces interactions.

Cependant, l'identification de partenaires potentiels lors d'un crible double-hybride implique que ces fragments protéiques soient isolées dans système où ils sont surexprimés et fusionnés aux domaines d'activation ou de liaison à l'ADN de Gal4. La confirmation de ces interactions sera dès lors nécessaire par d'autres méthodes.

Perspectives

Au terme de ce travail, nous envisagerons à court terme de clôturer le séquençage des clones isolés lors du crible. Notons qu'une série de PCR utilisant des primers spécifiques de Spt8 et de Srb9 seront réalisées sur les clones restants afin de soustraire du lot les clones apparentés.

Après avoir réalisé les contrôles double-hybride classiques, à savoir, s'assurer qu'il n'y pas d'interaction entre les protéines proies isolées et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 seul, nous envisagerons à plus long terme d'éprouver ces interactions par une méthode biochimique. Nous nous proposons de tester ces interactions par immunoprécipitation d'un complexe en utilisant des Ac dirigés contre TFIIS.

Matériels et Méthodes

1. Matériel.

1.1. Les tampons.

tampon K_2HPO_4 1M

$\text{K}_2\text{HPO}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ 87,09 g

Porter à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée puis autoclaver.

tampon KH_2PO_4 1M

KH_2PO_4 68,045 g

Porter à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée puis autoclaver.

tampon K- PO_4 pH 7,0

K_2HPO_4 1M 61,5 ml

KH_2PO_4 38,5 ml

tampon de lyse

Triton X-100 2 %

SDS 1 %

NaCl 100 mM

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

tampon N2 (Nucleobond)

Tris/ H_3PO_4 100 mM

KCl 900 mM

EtOH 15 %

pH 6,3

tampon N3 (Nucleobond)

Tris/ H_3PO_4 100 mM

KCl 1150 mM

EtOH 15 %

pH 6,3

tampon N5 (Nucleobond)

Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
KCl	1000 mM
EtOH	15 %
pH 8,5	

tampon S1 (Nucleobond)

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0	

autoclaver et ajouter une solution de RNase A pour atteindre une concentration finale de 400 µg/ml.

tampon S2 (Nucleobond)

NaOH	200 mM
SDS	1 %

tampon S3 (Nucleobond)

KAc	2,8 M
pH 5,2	

tampon TAE 10x (gibco BRL)

Tris-Acetate	400 mM
EDTA	10 mM

tampon TE 10x

Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0	

1.2. Les solutions

Acide aminé et base azotée 10x

Adénine sulfate	0,2 g
Uracil	0,2 g
L-Tryptophan	0,2 g
L-Histidine-HCl	0,2 g
L-Leucine	0,3 g

Porter, séparément, à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée puis autoclaver. Conserver le tryptophane à 4°C et à l'abris de la lumière afin d'éviter sa dégradation.

Agarose

Agarose	0,5, 1 ou 2 g
---------	---------------

Porter à un volume de 100 ml avec du TAE en fonction de la concentration désirée. Porter à ébullition et laisser refroidir à une température de 55°C. Couler ensuite le gel sur un support approprié.

Ampicilline 10%

Ampicilline	100 mg
-------------	--------

Porter à un volume de 1 ml avec de l'eau distillée puis stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 µm. Conserver à -20°C. Ne pas ajouter à des milieux ayant une température supérieure à 55°C afin de ne pas dégrader l'antibiotique.

Glycérol 10%

Glycérol 100 %	20 ml
Eau distillée	180 ml

SOC

Tryptone	2 %
Yeast extract	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM

Autoclaver, ensuite ajouter du MgSO₄ (filtré stérilement) jusqu'à une concentration de 10 mM.

Solution de 3AT 2M

3AT	42,04 g
-----	---------

Porter à un volume de 250 ml avec de l'eau distillée, filtrer sur une stericup (millipore)

0,22 μ m. Conserver à 4°C.

Solution de bromophénol

Glycérol	5 ml
Bleu de bromophénol	2,5 ng
EDTA 1 M	0,5 ml

Solution de LiAc 10x

LiAc	10,2 g
------	--------

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée et autoclaver.

Polyéthylène glycol (PEG) 50 %

PEG 4000	50 g
----------	------

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, filtrer sur filtre millipore 0,45 μ m.

Mélange LiAc/TE

LiAc 10x	3,5 ml
TE 10x	3,5 ml
H ₂ O	28 ml

Mélange LiAc/TE/PEG 4000

LiAc 10x	2 ml
TE 10x	2 ml
PEG 50 %	16 ml

ADN de sperme de saumon (SS-DNA)

SS-DNA	2mg
--------	-----

Dissoudre dans 1ml de TE 1x. Passer dans une seringue pour réduire la taille des brins grâce au force de cisaillement. Stériliser par filtration sur filtre millipore 0,22 μ m. Conserver à 4°C.

Avant chaque utilisation, dénaturer à 100°C pendant 5 min.

Solution de X-GAL 4%

X-GAL

40mg

Dissoudre dans 1 ml de NN' diméthylformamide.

SDS 10%

SDS

1g

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée

Termineur Ready reaction Mix

ddATP

ddCTP

ddGTP

ddTTP

dATP, dCTP, dGTP et dTTP

Tris-HCl pH 9

MgCl₂

Pyrophosphatase thermostable

AmpliTaq DNA Polymérase, FS

2. Méthode.

2.1. Souches et plasmide.

2.1.1. souche de bactérie.

La souche utilisée est DH 10B⁺: *F⁻ mcrA*, γ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*dlacZ⁺M15*, *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, γ (*ara,leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^{-} , *rspL*, *nupG*

Cette souche possède les caractéristiques suivantes :

- *recA1* réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène,
- *endA1* améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique en diminuant le taux d'endonucléase,
- Δ lac est une délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.

Cette souche est utilisée pour la réplication des constructions plasmidiques. Elle est mise en culture à 37°C dans du milieu de Luria-Bertani (LB). Dans le cas d'une sélection d'un plasmide ampicilline résistant, de l'ampicilline est ajoutée au milieu LB à une concentration de 100 µg/ml.

2.1.2. Souche de levures.

* Y190 MATa *gal 4 gal 80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3, -112 + URA3::GAL-->LacZ, LYS2::GAL(UAS)-->HIS3 cyhR*

La souche Y190 est la souche utilisée pour faire le crible double hybride. Celle-ci contient deux gènes rapporteurs (*lacZ* et *HIS3*) sous le contrôle d'un promoteur GAL4

* Souche Δ ppr2 MATa *ade2-101uaa ura3-52 lys2-801uag trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1 ppr2::hisG-URA3-hisG*

Cette souche a été utilisée pour vérifier la fonctionnalité de la protéine de fusion Gal4 DB-TFIS.

2.1.3. Les plasmides.

2.1.3.1. Le plasmide pGBT9.

Ce plasmide multicopie (figure M1) possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *TRP1*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN de GAL4, suivi en aval par un polylinker permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine de liaison à l'ADN de GAL4.

2.1.3.2. Le plasmide pAS.

Ce plasmide multicopie (figure M2) possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *TRP1*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN de GAL4, suivi en aval par un polylinker permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine de liaison à l'ADN de GAL4.

2.1.3.3. Le plasmide pACTII.

Ce plasmide multicopie (figure M3) possède le gène de résistance à l'ampicilline, un marqueur *LEU2*, un promoteur ADH en amont du gène codant pour le domaine d'activation de GAL4, suivi en aval d'un polylinker permettant de réaliser des fusions entre des protéines et le domaine d'activation de GAL4.

Une banque génomique de levure composée de fragments d'une taille moyenne de 700 pb a été clonée au niveau du polylinker afin de générer des fusions utilisées en double-hybride.

2.2. Milieu de culture.

2.2.1. Milieux de culture bactérien.

2.2.1.1. Milieu LB liquide.

Tryptone 10g/l

NaCl 5g/l

Yeast Extract 5g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver 20 min à 120°C

2.2.1.2. Milieu LB solide.

Tryptone 10g/l

NaCl 5g/l

Yeast Extract 5g/l

Agar 20g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver 20 min à 120°C. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C et couler les boîtes de Petri. Conserver celles-ci à 4°C

Notons que de l'ampicilline peut être ajoutée au milieu LB liquide ou solide. L'antibiotique est additionner au milieu, ayant été autoclavé, à une température de 55°C pour atteindre une concentration finale de 100 µg/ml

2.2.2. Milieux de culture levurien.

2.2.2.1. Milieu YPD liquide.

Glucose 20g/l

Peptone 20g/l

Yeast Extract 10g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver 20 min à 120°C

2.2.2.2. Milieu YPD liquide.

Glucose	20g/l
Peptone	20g/l
Yeast Extract	10g/l
Agar	20g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver 20 min à 120°C. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C puis couler dans des boîtes de Pétri, et les conservées à 4°C

2.2.2.3. Milieu minimum.

Yeast Nitrogen Base	
w/o amino acids and	
w/o ammonium sulfate	1,75g/l
Ammonium sulfate	5,1 g/l
Glucose	20g/l

Pour faire un milieu minimum solide, ajouter également

Agar	20g/l
------	-------

Porter à volume avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 min à 120°C

2.2.2.4. Milieu synthétique.

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant différents acides aminés et bases azotées dans le milieu minimum.

Un mélange des constituant du milieu synthétique sans adénine, uracile, tryptophane, histidine ni leucine (molécules généralement utilisés pour la sélection des souches) a été préparé suivant les proportions reprises dans le tableau M1.

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids		
	w/o ammonium sulfate	50g
Ammonium sulfate		146,55g
L-Arginine sulfate		0,6g
L-Isoleucine		0,9g
L-Lysine-HCl		0,9g
L-Methionine		0,6g
L-Phenylalanine		1,5g
L-Tyrosine		0,9g
L-Valine		4,5g

Tableau M1 : composants du mélange pour le milieu synthétique

En pratique:

Mélange pour milieu synthétique	7,3g/l
Glucose	20g/l
Agar (pour un milieu solide)	20g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 min à 120°C

2.2.2.5. Milieu synthétique + 3AT.

- préparer un milieu synthétique solide ne contenant pas d'histidine
- Autoclaver 20 min à 120°C
- laisser refroidir le milieu à une température de 55°C
- ajouter le 3AT
- couler le milieu dans des boîtes de Petri et conserver à 4°C

2.3. Techniques relatives à l'utilisation de bactérie.

Transformation des bactéries par électroporation

Cette méthode consiste à soumettre les bactéries à un choc électrique assez important. Cette décharge déstabilise la membrane cellulaire, ce qui entraîne la formation de pores dans celle-ci permettant ainsi à l'ADN plasmidique de rentrer

Pour l'électroporation, il est nécessaire de préparer des cellules électrocompétantes. Cette préparation consiste essentiellement à laver les cellules afin d'éliminer le plus de sels possible.

En pratique :

a) Préparation des cellules électrocompétantes

- réaliser une préculture O/N à 37°C dans 5 ml de LB
- inoculer 800ml de LB au moyen de la préculture
- incuber à 37°C jusqu'à une DO (mesurée à 600 nm) comprise entre 0,5 et 1
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 800 ml d'eau stérile à 4°C
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 400 ml d'eau stérile à 4°C
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10% à 4°C
- centrifuger la culture 15 min. à 4000 rpm et 4°C
- resuspendre le culot dans 2 ml de glycérol 10% à 4°C
- aliquoter dans des Eppendorfs
- stocker les cellules à -80°C

b) l'électroporation

- dégeler un aliquot sur glace
- stériliser les cuvettes d'électroporation en les plaçant sous la lampe à UV pendant 3 min
- mettre les cuvettes sur glace
- mélanger dans un Eppendorf 40 µl de cellules et 1 à 4 µl d'ADN
- laisser une minute sur glace

- transférer le mélange dans la cuvette et remettre sur glace
- régler l'électroporateur (Gene Pulser) sur 25 μ F, 2,2 kV et 200 Ω .
- placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer
- ajouter immédiatement après l'électroporation 1 ml de SOC
- incuber une heure à 37°C
- étaier sur des boîtes LBamp

remarque à propos des réglages de l'électroporateur

- capacitance : 25 μ F. La durée du choc est proportionnelle à la capacitance. On règle donc l'appareil sur sa valeur maximale afin d'avoir un choc le plus long possible ce qui favorise l'entrée du plasmide
- voltage : 2,2 kV. Cela correspond à l'intensité du choc électrique. Cette valeur résulte d'un compromis entre nécessité de créer des pores et survie de la cellule
- résistance : 200 Ω . Cela correspond à la résistance de la solution contenue dans la cuvette

2.4. Techniques relatives à l'utilisation de levures.

2.4.1. Transformation de levures.

2.4.1.1. Transformation par la technique au LiAc.

- faire une préculture dans 50ml de milieu sélectif jusqu'à une DO (mesurée à 600nm) de 0,6 à 1
- centrifuger à 5000 rpm pendant 5 min
- resuspendre le culot dans 25 ml d'eau stérile
- centrifuger à 5000 rpm pendant 5 min
- resuspendre dans 1 ml de LiAc 1x
- centrifuger à 14000 rpm pendant quelques sec.
- resuspendre dans 400 μ l de LiAc 1x
- prélever 50 μ l de cellule par transformation et centrifuger à 14000 rpm pendant quelques sec.

- ajouter dans l'ordre : 240 µl de PEG 50%
 36 µl de LiAc 10x
 25 µl de SS-DNA (préalablement dénaturé 5 min à 100°C puis
 gardé sur glace)
 50 µl d'eau + plasmide
- vortexer afin de ressuspendre le culot
- incuber 30 min à 30°C
- choc thermique 20 min à 42°C
- centrifuger à 8 000 rpm pendant 30 sec
- ressuspendre le culot dans 200 µl d'eau stérile puis étaler sur boîtes

2.4.1.2. La méthode de transformation pour la banque double-hybride.

- réaliser une préculture dans 200ml de milieu sélectif.
- incubation O/N à 30°C.
- dilution de la culture dans 500ml de YPD afin d'obtenir une DO (mesurée à 650nm) inférieure à 0,3.
- incubation à 30°C afin d'arriver à une DO (mesurée à 650nm) supérieure à 0,7
- centrifuger la culture 5 min. à 5000 rpm.
- laver le culot avec 50ml d'eau stérile
- centrifuger la culture 3 min. à 6000 rpm.
- laver le culot avec 50ml d'eau stérile
- centrifuger la culture 3 min. à 6000 rpm.
- laver le culot avec 50ml de LiAc/TE
- centrifuger la culture 3 min. à 6000 rpm.
- resuspension du culot dans 2,5ml de LiAc/TE
- dans un Eppendorf mettre :
 - 2 µg d'ADN de banque
 - 40 µl d'ADN carrier préalablement dénaturé 5 min. à 100°C puis maintenu sur glace
 - 100 µl de cellules
 - 600µl de LiAc/TE/PEG4000
- incubation 2h30 à 30°C avec agitation toutes les demi-heures
- choc thermique 20 min. à 42°C
- centrifuger 1 min. à 10000 rpm.
- ressuspension du culot dans 600 µl d'eau stérile.
- étaler sur boîte

2.4.2. Coloration X-GAL.

- préparer 5 ml d'agarose 1% dans de l'eau et mettre à 50°C
- faire chauffer jusqu'à 50°C 5 ml de tampon K-PO₄ pH 7,0
- mélanger les deux solutions précédentes
- ajouter 0,1 ml de SDS
- ajouter 0,6 ml de NN' diméthylformamide
- ajouter 0,1ml de X-GAL 4%
- mélanger et couler une surcouche de 10 ml sur la boîte à colorer.
- attendre la solidification puis incuber O/N à 30°C

2.5 Techniques relatives à l'ADN.

2.5.1. Préparation de la banque double hybride.

- décongeler sur glace les bactéries contenant la banque
- étaier les cellules sur des boîtes LB contenant de l'ampicilline
- culture O/N à 37°C
- ajouter 5 ml de LBamp liquide sur la boîte
- racler la boîte avec un râtelier afin de ressuspendre les cellules
- récupérer le liquide
- recommencer 3 fois le raclage de la boîte
- centrifuger les cellules 10 min à 5000 rpm
- laver le culot avec 50 ml d'eau stérile
- centrifuger les cellules 10 min à 5000 rpm
- ressuspendre le culot dans 12 ml de tampon S1 contenant de la RNase pour dégrader l'ARN
- ajouter 12 ml de tampon S2
- incuber 5 min à température ambiante
- ajouter 12 ml de tampon S3
- incuber 10 min sur glace
- centrifuger 45 min à 13 000 rpm et 4°C
- équibrer une colonne AX500 (nucleobond) avec 5 ml de tampon N2
- passer le surnageant sur la colonne
- laver deux fois la colonne avec 12 ml de tampon N3
- éluer l'ADN avec 12 ml de tampon N5

- ajouter 8,4 ml d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN
- centrifuger 45 min à 13 000 rpm et 4°C
- laver le culot avec 4,2 ml d'éthanol froid (-20°C)
- centrifuger 15 min à 13 000 rpm et 4°C
- sécher le culot au speed vack pendant 15 min
- ressuspendre le culot dans 200 µl d'eau.

2.5.2. Extraction d'ADN de levure.

- faire une préculture dans 4ml de milieu sélectif
- centrifuger 1 min à 14 000 rpm
- ressuspendre le culot dans 100 µl de tampon de lyse
- ajouter 100 µl de bille de verre d'un diamètre de 425 à 600 microns
- ajouter 100 µl de PCI
- vortexer pendant 2 min
- mettre sur glace
- centrifuger 20 min à 14 000 rpm et 4°C
- récupérer la phase supérieure
- ajouter 500 µl de tampon PB
- faire passer sur une colonne QIAprep (QIAGEN)
- centrifuger 1 min à 14 000 rpm et 4°C
- laver la colonne avec 750 µl de tampon PE
- centrifuger 1 min à 14 000 rpm et 4°C
- centrifuger 1 min à 14 000 rpm et 4°C pour bien enlever les solutions
- ajouter 100 µl d'eau afin d'éluer l'ADN
- centrifuger 1,5 min à 14 000 rpm et 4°C

2.5.3. La Polymerase Chain Reaction (PCR).

2.5.3.1. Principe général.

La PCR est utilisée pour amplifier un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues. Deux oligonucléotides (ou primers) complémentaires de ces séquences sont utilisés comme amorces de la réaction de PCR catalysée par une ADN Polymérase. Ces primers, d'une vingtaine de nucléotides, bordent donc la séquence à amplifier et doivent être le plus spécifique possible de ces régions.

L'ADN à amplifier, ou "ADN template", est d'abord dénaturé par chauffage. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à une température, dites d'annealing, qui permet aux primers de s'hybrider à leur séquence cible. Il faut cependant remarquer que lors de l'hybridation, il y a une compétition entre l'hybridation des primers à leurs séquences cibles et la réhybridation des templates. Mais comme les primers sont en large excès molaire il y a préférentiellement hybridation de ceux-ci. Le mélange est ensuite amené à une température propice à la réaction de polymérisation; cette température est en règle générale située aux alentours de 72°C. Ce cycle de dénaturation, d'hybridation et de synthèse de l'ADN est répété plusieurs fois. De cette façon, les produits d'un cycle d'amplification servent de matrices aux amplifications suivantes. Le produit majeur de cette réaction exponentielle est un segment d'ADN double brin dont les extrémités sont définies par les extrémités 5' des deux primers et dont la longueur est définie par la distance séparant ces deux primers.

Cette réaction de Polymerase Chain Reaction étant exponentielle, il est bien entendu très important d'éviter toute contamination des réactifs par de l'ADN qui pourrait être amplifié.

2.5.3.2. Les paramètres et réactifs utilisés.

Les primers:

Ceux-ci doivent être d'une longueur minimale de 16 nucléotides afin de permettre une hybridation correcte à la matrice. Une concentration de 0,5 pmole de primer par μ l de mélange réactionnel est généralement utilisée. Il est à noter qu'une trop forte concentration peut entraîner un amorçage erroné de la polymérisation à des sites non spécifiques.

Les enzymes:

Différentes polymérases existent sur leur marché chacune d'elle ayant ses spécificités:

- La Taq DNA Polymerase:

Cette enzyme a une activité de polymérisation 5'-3' mais ne possède pas d'activité exonucléase 3'-5'. La Taq polymérase n'a donc pas d'activité « proofreading » exonucléasique.

Son temps de 1/2 vie est: de 2 h à une température de 92,5°C.
40 min. à une température de 95°C.
5 min. à une température de 97°C.

- La Pfu turbo DNA Polymerase:

Contrairement à la Taq DNA Polymerase, cette enzyme possède une activité exonucléase 3'-5', ce qui lui confère une activité « proofreading ». On estime que cette enzyme a un taux d'erreurs 10x inférieur à la Taq DNA Polymerase.

Son temps de 1/2 vie est de 2 h à une température de 100°C.

Remarque:

Pour l'amplification de grands fragments (< 20 Kb), d'autres enzymes sont disponibles sur le marché. On peut citer par exemple: l'Elongase ou la TaKaRa.

Les dNTP:

Les concentrations des 4 dNTP doivent être équivalentes et relativement basses, ce qui permet d'augmenter la fidélité de la polymérisation. En effet, une augmentation de la concentration en dNTP favorise l'élongation au détriment du système correcteur. Cela semble vrai en tout cas pour des concentrations > 1 mM.

Le tampon:

Le tampon standard contient:

KCl	50 mM
Tris-HCl	10 mM

MgCl₂

1,5-2 mM

Le KCl facilite l'hybridation de la sonde. Quant au Magnésium, sa concentration est critique et peut affecter l'activité et la fidélité de l'enzyme assurant la polymérisation.

L'hybridation des primers:

La température et la durée requise pour l'hybridation des primers dépend de leur composition nucléotidique, de leur longueur et de leur concentration. Pratiquement, on applique une température d'annealing de 5°C inférieure à la température de melting (T_m) des primers. La température de melting se calcule en règle générale par la formule:

$$T_m = (4^{\circ}\text{C} \times \text{le nombre de nucléotides GC}) + (2^{\circ}\text{C} \times \text{le nombre de nucléotides AT}).$$

Le nombre de cycles d'amplification dépend de la concentration de l'ADN cible dans le mélange réactionnel. Le nombre de molécules cibles doit être de l'ordre de 10⁵ à 10⁶ molécules, ce qui équivaut à 10 ng d'ADN de levure et 1 ng d'ADN d'*E. coli*. Le nombre de cycles sera donc choisi en fonction du nombre de molécules cibles présentes:

3 10 ⁵ molécules	25 à 30 cycles
1,5 10 ⁴ molécules	30 à 35 cycles
1 10 ⁴ molécules	35 à 40 cycles
50 molécules	40 à 45 cycles

En pratique:

Placer dans un tube PCR:

Composants	Volume	[] finale
Tampon PCR 10x	5 µl	1x
Mix dNTPs 5mM (chacun)	4 µl	0,2 mM chacun
Primer 5'	x µl	0,5 µM
Primer 3'	x µl	0,5 µM

ADN matrice	x μ l	10 ng - 1 μ g
Enzyme (Taq polymérase ou Pfu turbo)	1,5 μ l	1,5 U

Porter à un volume de 50 μ l avec de l'eau stérile.

Réaliser le cycle suivant:

Dénaturation 3-5 minutes à 94°C	
Dénaturation 1 minutes à 94°C	Réaliser
Hybridation 1 minutes (50 à 65°C)	25 - 45
Elongation 2 minutes (ou plus) à 72°C	cycles
Fin de l'élongation 10 minutes à 72°C	

2.5.4. Le séquençage.

2.5.4.1. Le Séquençage manuel de produit PCR

Principe du séquençage.

La méthode utilisée est celle des terminateurs de chaînes. (Sanger *et al*, 1977). Cette méthode consiste à faire synthétiser par une polymérase un brin complémentaire à celui que l'on désire séquencer. Cette polymérase requiert une matrice simple brin et une amorce lui fournissant un groupement 3'-OH libre. Le fragment à séquencer est cloné dans un plasmide.

Le primer utilisé est un oligonucléotide synthétique dont la séquence est complémentaire à celle qui borde l'insert sur le vecteur utilisé.

L'incorporation au hasard dans la chaîne naissante d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP), un analogue de désoxyribonucléotide ne possédant pas de groupements hydroxyle en 3' interrompt l'élongation. Statistiquement la terminaison se produira au moins une fois en chaque point.

Quatre tampons d'élongation sont utilisés. Ils contiennent les quatre désoxyribonucléotides usuels (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dont un est marqué

radioactivement ($[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP). Par contre, ils ne contiennent qu'un des quatre didésoxyribonucléotides.

Chacun des quatre tubes réactionnels contient en fin de réaction une population de fragments de taille variable. La taille de ces fragments permet de déterminer la position à laquelle s'est incorporé le ddNTP dans la chaîne en élongation et donc la position de la base complémentaire dans le brin que l'on a séquencé.

En pratique

Pré-traitement enzymatique des produits PCR.

Cette étape sert à éliminer les primers et les nucléotides libres présents dans le produit PCR

- mélanger 5 μl de produit PCR
 1 μl d'exonucléase
 1 μl de phosphatase alcaline de crevette
- incuber 15 min à 37°C puis 15 min à 80°C afin d'inactiver les enzymes

Réaction d'hybridation

- ajouter 3 μl de primer (à une concentration de 2,5 μM)
- dénaturer 3 min à 100°C puis mettre sur glace pendant 5 min

Réaction de marquage

- ajouter 2 μl de tampon concentré
 2 μl de « labelling mix » dilué 4X
 0,5 μl de $[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP
 2 μl Sequenase DNA Polymerase
- incuber 3 min à température ambiante.

Réaction de terminaison

- Dans 4 nouveaux tubes ajouter 2,5 µl de l'un des mélanges de terminaison
- échantillonner le mélange marqué à raison de 3,5 µl par tube
- incuber 5 min à 37°C
- Ajouter 4 µl de solution stop

Préparation du gel

- mélanger:
 - 42 gr d'urée
 - 45 ml d'eau
 - 10 ml de TBE 10 x
 - 15 ml de solution de polyacrylamide.
- après dissolution de l'urée, filtrer au Buchner (filtre Millipore SA 78).
- ajouter:
 - 600 µl de persulfate
 - 30 µl de Temed.

Fabrication du gel de séquençage

- nettoyer les plaques avec eau de ville - eau distillée - ethanol.
- "coater" la petite plaque avec 10 ml de dimethyl dichloro silane (silicone).
- placer les spacers.
- refermer les plaques et sceller au "tape" jaune (s'aider des pinces).
- couler le gel en oblique mais le laisser polymeriser à l'horizontal.
- faire une ligne de base avec deux peignes retournés.
- préchauffer le gel (15 minutes si utilisé tout de suite ou 30 minutes s'il a été mis à 4°C la nuit).

Mise sur gel

- mettre les bases 3 minutes à 90°C pour les dénaturer avant de les charger sur le gel.
- laisser migrer 3 minutes après chaque chargement de quatre bases pour laisser pénétrer.
- laisser migrer le temps voulu.

Après la migration

- retire la petite plaque de façon à ce que le gel reste sur la grande plaque.
- mettre la solution de fixateur sur le gel pendant 10 minutes.
- mettre un buvard whatman (3MM Chr) sur le gel afin que celui-ci se fixe dessus.
- recouvrir le gel transféré sur le buvard avec un saran.
- sécher sous vide à 80°C pendant une heure et demie.

- mettre le gel en cassette avec un film d'autoradiographie pendant 12 heures.
- révéler le film pendant 5 minutes.
- rincer à l'eau.
- fixer le film pendant 15 minutes.
- rincer à l'eau et sécher.

La migration concomitante des quatre mélanges réactionnels sur gel de polyacrylamide permet une lecture de la séquence d'ADN.

2.5.4.2. Le Séquençage automatique.

Le séquençage automatique se base aussi sur la méthode des terminateurs de chaînes (Sanger *et al*, 1977). Les ddNTP ou terminateur de chaîne ("dye-terminators") sont, dans ce cas-ci, marqués par une molécule fluorescente qui, une fois excitée par un laser, émet un rayonnement d'une longueur d'onde précise. Chacune des quatre bases (A, C, G, T) est marquée par une molécule différente.

L'incorporation des quatre terminateurs de chaînes est réalisée en une seule réaction par PCR avec un seul primer. Les étapes successives de dénaturation, d'hybridation et d'extension ont pour résultat l'amplification des produits d'extension. Ces produits sont ensuite purifiés par précipitation à l'éthanol afin d'éliminer les terminateurs en excès et chargés sur un gel de polyacrylamide. La lecture de ce gel est effectuée par un logiciel par détection des quatre rayonnements correspondant à chaque base. Il est à noter que les quatre "dye-terminators" étant chacun marqué différemment, ils sont mis à migrer sur une seule piste, contrairement au séquençage manuel.

En pratique:

a) La réaction de Cycle sequencing:

- mélanger:

Terminator ready reaction Mix:	8 µl.
Primer (1 µM):	3,2 µl.
DNA template: - produit PCR:	+/- 200 ng.

- porter à 20 µl avec de l'eau stérile.
- réaliser les cycles PCR suivant:

96°C pendant 30 secondes	répéter
50°C pendant 15 secondes	25 fois
60°C pendant 4 minutes	ce cycle.

b) Purification des produits de la réaction:

- ajouter au produit PCR 2 µl d'acétate de sodium 3M pH 4,6 et 50 µl d'éthanol 95%.
- vortexer et mettre sur glace pendant 10 minutes.
- centrifuger à 4°C pendant 30 minutes à 14000rpm.
- éliminer l'éthanol.
- laver le culot avec 250 µl d'éthanol 70%.
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 14000rpm.
- éliminer l'éthanol.
- sécher le culot sous vide.
- resuspendre le culot dans 6 µl de tampon de chargement.
- dénaturer cet échantillon pendant 2 min. A 90°C.
- déposer 1,5 µl sur gel de polyacrylamide.

2.5.5. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

- Cette technique permet:
- de séparer des fragments d'ADN de tailles différentes (dans un but diagnostique ou de purification).
 - d'estimer la taille de fragments d'ADN via un marqueur de taille.
 - d'estimer la concentration d'ADN via un marqueur de masse.

Cette technique consiste à soumettre l'ADN à un champ électrique. Cet ADN étant chargé négativement, il va migrer vers l'anode. Différents facteurs peuvent influencer cette migration:

- a) Le poids moléculaire des fragments d'ADN: il existe une relation inversement proportionnelle entre la vitesse de migration et le poids moléculaire d'un fragment d'ADN.

b) La conformation de l'ADN. Un même plasmide peut prendre différentes conformations. La forme plasmidique superenroulée ou CCC (Covalently Closed Circular) migre plus vite que les formes OL (Open Linear) et OC (Open Circular).

c) La concentration en agarose. Il y a une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité électrophorétique de l'ADN (μ) et la concentration de gel (τ). Cette relation est décrite par l'équation suivante:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau$$

où μ_0 est la mobilité électrophorétique libre et K_r le coefficient de retard (constante dépendant des propriétés du gel et de la taille de l'ADN).

En règle générale, un gel plus concentré (1,5 à 2%) permettra de séparer des fragments de petites tailles (100 à 3000 bp); tandis qu'un gel plus lâche permettra de séparer des fragments de plus grandes tailles. Vous trouverez ci-dessous la concentration de gel idéale pour les différentes tailles d'ADN à séparer.

Quantité d'agarose dans le gel (%)	Taille des fragments d'ADN séparés (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

d) Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est directement proportionnelle au voltage appliqué.

e) La composition du tampon d'électrophorèse. La mobilité électrophorétique de l'ADN est affectée par la composition et la force ionique du tampon d'électrophorèse. En l'absence d'ions, la conductivité électrique est minimale et l'ADN migre plus lentement. Néanmoins, une forte concentration ionique peut entraîner une conductivité électrique si importante qu'il peut se produire une forte augmentation de température dans le gel, ce qui peut entraîner une dénaturation de l'ADN.

Pour visualiser les bandes d'ADN, il est nécessaire de mélanger du bromure d'éthidium au gel d'agarose. Le bromure d'éthidium est une molécule fluorescente qui

s'intercale entre les deux brins des molécules d'ADN et permet ainsi de repérer l'ADN sous U.V. (à 302 nm). Il est à noter qu'il est possible de photographier le gel d'agarose sous U.V.

En pratique:

- dissoudre en chauffant une quantité appropriée d'agarose dans du tampon TAE.
- ajouter 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.
- couler le gel dans un support plexiglas.
- ajouter un ou deux peignes pour former des puits dans le gel.
- laisser le gel polymériser.
- enlever les peignes et démouler le gel.
- placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- immerger complètement le gel dans du tampon TAE.
- placer les échantillons, alourdis par du bleu de bromophénol (solution d'alourdisseur/colorant) à raison de 1/10 du volume final, dans les puits.
- charger également dans un ou plusieurs puits un marqueur de taille (ou de masse) approprié.
- laisser migrer.

Il est recommandé de ne pas migrer à un voltage supérieur à 100 Volts pour avoir une bonne séparation des différentes bandes d'ADN.

- visualiser les bandes d'ADN sous U.V.

Attention: il est recommandé d'utiliser des gants pour manipuler tout ce qui est, ou a pu, être en contact avec le bromure d'éthidium ainsi que de se protéger les yeux des rayons U.V. à l'aide d'un casque ou de lunettes en plexiglas.

Annexes

Annexe A : séquence protéique de TFIIS.

1
MDSKEVLVHVKNLEKNKSNDAAVLEILHVLDKEFVPTEKLLRETKVGVE

51
VNKFKKSTNVEISKLVKKMISSWKDAINKNKRSRQAQQHHQDHAPGNAE

101
DKTTVGESVNGVQQPASSQSDAMKQDKYVSTKPRNSKNDGVDTAIYHHK

151
LRDQVLKALYDVLAKESEHPPQSILHTAKAIESEMKNVNNCDTNEAAYK

201
ARYRIIYSNVISKNNPDLKHKIANGDITPEFLATCDAKDLAPAPLKQKI

251
EEIAKQNLVNAQGATIERSVTDRFTCGKCCKEKKVSYYQLQTRSADEPLT

301
TFCTCEACGNRWKFS

Annexe B : séquence protéique de Spt8.

1
MDEVDDILINNQVVDDEEDDEEMLSGLENDISKQDLEGNDGGEDEEDDDD

51
DDEDDDDDEDEREDDDEQEDDDGEDDAARMDKTATPTNEHQHDEQKAAAA

101
GAGGAGDSGDAVTKIGSEDKLSVDVGGVGSREASSSTHEASANGEVYFY

151
YKMLNAAQIADSYNIYPTAAIPIQTHVNALAVSRGLKYLFLGGSDGYIR

201
KYDLLNTLEGKLSLTILQKHSLAESIQNAGILQSYWENEIPQKKSEMKLS

251
ANKTDYEPKVSPVHSLEVQSECLFILSGLQNGGITMQGVRYMEGSIAHYF

301
KGRNGHTQIVNILRLNGQEDRFLSGSWDKRLLEWDLQTGDIVNEFKKSRS

351
ELSSLEMRPLYSSVDVSGNVNSGKENENADDDMDSLFGDEDEDEKQDAGN

401
EPVETGDGSNGEENKEQISEESLNIVYDESVFMTSGLNGSVHIWDRMTQ

451
SPALSLERGAGVPPWCLSACWGVGDHVVYAGRRNACVEQFDLKMPSPKPIH

501
NLKLPSISGPVSCVKAMPNNKHLLCASRDNIRLYNVEIAVDASNSTTKSS

551
KVPFLIVPGHHGGIISNLYLDPTSRFIIISTSGNRGWQGNSTDTTLIYDID

601
LE

Bibliographie

Awrey D. E., Weilbaeher R.G., Hemmings A., Orlicky S.M., Kane C. M. and Edwards A.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (23) : 14747-57.

Bartolomei M. S., Halden N. F., Cullen C. R. and Corden J. L. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8** : 330-9.

Brownell J.E., Zhou J., Ranalli T., Kobayaski R., Edmondson D. G., Roth S. Y. and Allis C.D. (1996) *cell* **84** :845-51.

Buratowski S., Hahn S., Guarente L. and Sharp P. A. (1989) *Cell* **56** : 549-61.

Burley S. K. and Roeder R. G. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65** : 769-99.

Dynlacht B. D., Hoey T. and Tjian R. (1991) *Cell* **66** : 563-76.

Feaver W.J., Svejstrup J. Q., Henry N. L. and Kornberg R. D. (1994) *Cell* **79** :1103-9.

Hampsey M. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (2) :465-503.

Hampsey M. and Reinberg D. (1999) *Current Opinion Genetics And Davelopment* **9** : 132-39.

Hubert J. C., Guyanvarch A., Kammerer B., Exinger F., Liljelund P. and Lacroute F. (1983) *EMBO J.* **2** : 2071-3.

Johnson T.L. and Chamberlin M.J. (1994) *Cell* **77** : 217-24.

Kassavetis G.A. and Chamberlin M.J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256** (6) : 2777-86.

Kim Y. J., Björklund S., Li Y., Sayra M. H. and Kornberg R. D. (1994) *Cell* **77** : 599-608.

Kingston R. E., Bunker C. A. and Imbalzaro A. N. (1996) *Genes Dev.* **10** : 905-20.

Pan G. and Greenblatt J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (39) : 24563-71

Roberts S. M. and Wilson F. (1997) *Genetics* **147** : 451-65.

Rougvie A. E. and Lis J. T. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**(11) : 6041-5.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**(12) : 5463-7.

Sawadogo M., Sentenac A. and Fromageot P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255** (1) : 12-5.

Tan S., Conaway R. C. and Conaway J. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 6042-6

Thompson C. M., Koleske A. J., Chao D. M. and Young R. A. (1993) *Cell* **73** : 1361-1375.

Uptain S.M., Kane C. M. and Chamberlin M. J. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66** : 117-72.

Varshavsky A. J. and Georgiev G. P. (1975) *Mol. Biol. rep.* **2** (3) : 255-62.

Wang D. and Hawley D. K. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 843-47.

Wittschieben B., Otero G., de Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., Ohba R., Li Y., Allis C. D., Tempst P. and Svejstrup J. Q. (1999) *Molecular Cell* **4** : 123-8.